

抗生素质控分析中 HPLC 分析方法的理论与实践

高效液相色谱法在抗生素质控分析中的应用

(下册)

胡昌勤 编著

化学工业出版社

抗生素质控分析中 HPLC 分析方法的理论与实践

高效液相色谱法在抗生素质控分析中的应用

(下册)

胡昌勤 编著

气象出版社

内 容 简 介

本书作为《抗生素质控分析中 HPLC 分析方法的理论与实践》一书的下册,主要介绍 HPLC 方法在抗生素质控分析中的应用。

全书共分 7 章,分别介绍了 HPLC 分析方法在 β -内酰胺抗生素,大环内酯类抗生素,喹诺酮抗生素,多肽、多烯类抗生素等逐一品种质控分析中的应用。书中涉及的抗生素品种除国内常见的品种外,还包括了近年来国内外新开发的诸热点品种;对利用 HPLC 法进行实际样品分析中应注意的关键点,不同色谱分析方法的比较等进行了系统地介绍,并附有典型的色谱图。

本书对从事药物分析,特别是从事抗生素分析、质量控制、新药开发、教学、科研工作者有参考和实用价值,亦可作为大专院校高年级学生和研究生色谱分析、药物分析课的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

高效液相色谱法在抗生素质控分析中的应用/胡昌勤
编著.-北京:气象出版社,2001.7
ISBN 7-5029-3188-0

I. 高… I. 胡… III. 液相色谱-应用-抗生素
-药物分析 IV. R978.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 042474 号

高效液相色谱法在抗生素质控分析中的应用

(下册)

胡昌勤 编著

责任编辑:王桂梅 终审:周诗健

封面设计:王编 责任技编:陈红 责任校对:郝玉

* * *

气象出版社出版

(北京市海淀区中关村南大街 46 号 邮编:100081)

北京市宏远兴旺印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行 全国各地新华书店经销

* * *

开本:787×1092 1/16 印张:15.75 字数:403 千字

2001 年 7 月第一版 2001 年 7 月第一次印刷

印数:1~3000 定价:78.00 元

ISBN 7-5029-3188-0/R·0045

前 言

高效液相色谱技术是 20 世纪 70 年代后期发展最快的分析化学的分支,由于其在分离、检测过程中比较温和,故对沸点高、分子量大、极性、热稳定性差的化合物表现出极强的生命力。在药物分析的各个领域已得到广泛地应用。目前,高效液相色谱法已是药品质量控制的最常规方法之一。

在中国,高效液相色谱技术已逐渐被各级药品检验实验室所掌握,中国药典中采用高效液相色谱法进行鉴别、相关物质检查、组分控制和含量测定的品种逐年增加,但各实验室对高效液相色谱法的理解及掌握程度却存在不同程度的差别。虽然国内已有一些介绍高效液相色谱技术的专著,且在许多药物分析的专著中都有专门章节介绍高效液相色谱法,但前者主要偏重于色谱理论,与药物分析的具体实例结合得不够;而后者,对液相色谱的基础理论相对介绍得较少,使得药物分析工作者读起来感觉针对性不强。中国药典从 1995 年版起,高效液相色谱法被广泛用于对抗生素药品的质控分析。在 1996 年召开的全国各省、市、自治区药品检验所抗生素室主任工作会议上,与会代表根据中国抗生素分析的现状,酝酿编辑、出版一套较为完整的抗生素分析丛书,并成立了以金少鸿、仇士林、袁雯玮、仲国英、莫履强等抗生素分析专家组成的编委会,以推动我国抗生素分析的进一步发展。

本书作为抗生素分析丛书中的一册,力图将高效液相色谱的基础理论与抗生素分析的实践相结合,使读者能较为全面地了解如何建立一种色谱方法,如何评价一种色谱方法,如何应用一种色谱方法;并对目前常见的抗生素品种的高效液相色谱方法逐一进行了评述。书中的实例基本上是抗生素分析的具体实例,很多来自中国药品生物制品检定所抗生素室近年来的工作,因此本书也是对中国药品生物制品检定所抗生素室近年来高效液相色谱法应用成果的系统总结。自 1995 年以来,先后有多位同事(薛闻鹂、丁宏、成双红、尹利辉、杨亚莉、王立新、顾立素、陈鸿波、姚尚辰、余方键、张斗胜)和硕士研究生(袁耀佐、刘巍、杨剑宁、代红、姜红、王明娟、朱斌、刘英、涂林、杨利红)在抗生素室从事高效液相色谱分析工作,没有他们的工作,该书就不可能面世。

在本书的编写过程中,先后得到多位同仁、朋友的鼓励与支持。张维民先生帮助修改了部分文稿并绘制了部分图稿,成双红女士协助绘制了部分化学结构式及图稿,张力女士帮助查找档案资料并协助校对书稿。香港澳美制药厂、珠海联邦制药有限公司和法国阿万特公司为本书的出版提供了部分资金。当然,还有我的太太张靖溥和家人的长期鼓励与支持。在本书出版之际,我谨向他们致以最衷心的感谢。

面对着一个飞速发展的应用领域,加之时间仓促,水平有限,书中的错误和不妥之处在所难免,敬请专家和广大读者批评指正。希望随着高效液相色谱技术在抗生素分析中的深入应用,将做更多、更新的工作来充实丰富本书已经涉及和尚未涉及的内容。

胡昌勤

2001年6月

目 录

前言

1 HPLC 法在 β -内酰胺类抗生素质控分析中的应用	(1)
1.1 HPLC 法在青霉素质控分析中的应用	(1)
1.1.1 青霉素 G(Penicillin G)	(1)
1.1.2 氨苄西林(Ampicillin)	(2)
1.1.3 青霉素 V(Penicillin V)	(3)
1.1.4 哌拉西林(Piperacillin)	(5)
1.1.5 阿莫西林(Amoxicillin)	(6)
1.1.6 苯唑西林(Oxacillin)	(9)
1.2 HPLC 法在头孢菌素质控分析中的应用	(10)
1.2.1 头孢氨苄(Cephalexin)	(10)
1.2.2 头孢羟氨苄(Cefadroxil)	(11)
1.2.3 头孢拉定(Cefradine)	(13)
1.2.4 头孢克罗(Cefaclor)	(14)
1.2.5 头孢唑林(Cefazolin)	(17)
1.2.6 头孢替唑(Ceftezole)	(18)
1.2.7 头孢孟多(Cefamandole)/头孢孟多甲酯钠(Cefamandole nafate)	(19)
1.2.8 头孢替安(Cefotiam)	(21)
1.2.9 头孢呋辛(Cefuroxime)	(21)
1.2.10 头孢地秦(Cefodizime)	(23)
1.2.11 头孢哌酮(Cefoperazone)	(25)
1.2.12 头孢噻肟(Cefotaxime)	(26)
1.2.13 头孢他啶(Ceftazidime)	(27)
1.2.14 头孢唑肟(Ceftizoxime)	(27)
1.2.15 头孢美唑(Cefmetazole)	(29)
1.2.16 头孢甲肟(Cefmenoxime)	(30)
1.2.17 头孢匹胺(Cefpiramide)	(31)
1.2.18 头孢曲松(Ceftriaxone)	(32)
1.2.19 头孢地尼(Cefdinir)	(34)
1.2.20 头孢布烯(Ceftibuten)	(36)
1.2.21 头孢米诺(Cefminox)	(37)
1.2.22 头孢克肟(Cefixime)	(38)
1.2.23 头孢匹罗(Cefpirome)	(39)
1.2.24 头孢呋辛酯(Cefuroxime axetil)	(40)
1.2.25 头孢托伦酯(Cefditoren pivoxil)	(42)

1.2.26	头孢他美酯(Cefetamet pevoxil)	(43)
1.2.27	头孢泊肟酯(Cefpodoxim proxetil)	(45)
1.3	HPLC 法在其它 β -内酰胺类抗生素质控分析中的应用	(46)
1.3.1	氨曲南(Aztheonam)	(46)
1.3.2	拉氧头孢(Latamoxef)	(47)
1.3.3	氟氧头孢(Flomoxef)	(47)
1.3.4	亚胺培南(Imipenem)	(48)
1.3.5	美洛培南(Meropenem)	(50)
1.3.6	氯碳头孢(Loracarbef)	(52)
1.3.7	克拉维酸(Clavulanate)	(53)
1.3.8	舒巴坦(Sulbactam)	(54)
1.3.9	舒巴坦匹酯(Sulbactam pivoxil)	(55)
1.3.10	它唑巴坦(Tazobactam)	(56)
1.3.11	舒他西林(Sultamicillin)	(57)
1.4	HPLC 法在 β -内酰胺类抗生素复方制剂质控分析中的应用	(60)
1.4.1	阿莫西林钠(Amoxicillin sodium)/氟氯西林钠(Flucloxacillin sodium)	(60)
1.4.2	阿莫西林(Amoxicillin)/双氯西林钠(Dicloxacillin sodium)	(61)
1.4.3	氨苄西林钠(Ampicillin sodium)/舒巴坦钠(Sulbactam sodium)	(63)
1.4.4	阿莫西林(Amoxicillin)/克拉维酸钾(Clavulanate potassium)	(66)
1.4.5	替卡西林钠(Ticarcillin disodium)/克拉维酸钾(Clavulanate potassium)	(67)
1.4.6	哌拉西林钠(Piperacillin sodium)/他唑巴坦钠(Tazobactam sodium)	(68)
1.4.7	阿莫西林(Amoxicillin)/舒巴坦匹酯(Sulbactam pivoxil)	(70)
2	HPLC 法在大环内酯类抗生素质控分析中的应用	(72)
2.1	HPLC 法在 14 元环大环内酯类抗生素及其衍生物质控分析中的应用	(72)
2.1.1	红霉素(Erythromycin)	(72)
2.1.2	罗红霉素(Roxithromycin)	(73)
2.1.3	克拉霉素(Clarithromycin)	(76)
2.1.4	阿奇霉素(Azithromycin)	(78)
2.1.5	地红霉素(Dirithromycin)	(79)
2.1.6	红霉素环 11,12-碳酸酯(Erythromycin cyclic 11,12-Carbonate)	(81)
2.1.7	司丙红霉素(Erythromycin stinoprate)	(85)
2.1.8	依托红霉素(Erythromycin estolate)	(85)
2.1.9	琥乙红霉素(Erythromycin ethyl succinate)	(87)
2.2	HPLC 法在 16 元环大环内酯类抗生素及其衍生物质控分析中的应用	(88)
2.2.1	乙酰螺旋霉素(Acetylspiramycin)	(88)
2.2.2	必特霉素(4"-Acylspiramycins)	(90)

2.2.3	麦白霉素(Meleumycin)/麦迪霉素(Mydecamycin)	(92)
2.2.4	吉他霉素(Kitasamycin)	(93)
2.2.5	丙酸交沙霉素(Josamycin propionate)/交沙霉素(Josamycin)	(95)
2.3	HPLC 法在其它大环内酯类抗生素质控分析中的应用	(97)
2.3.1	FK560(Tacrolimus)	(97)
2.3.2	雷帕霉素(Rapamycin)	(98)
3	HPLC 法在喹诺酮抗生素质控分析中的应用	(101)
3.1	HPLC 法在喹啉羧酸类喹诺酮抗生素质控分析中的应用	(101)
3.1.1	诺氟沙星(Norfloxacin)	(101)
3.1.2	环丙沙星(Ciprofloxacin)	(102)
3.1.3	洛美沙星(Lomefloxacin)	(104)
3.1.4	氧氟沙星(Ofloxacin)/左氟沙星(Levofloxacin)	(106)
3.1.5	氟罗沙星(Fleroxacin)	(108)
3.1.6	司帕沙星(Sparfloxacin)	(109)
3.1.7	加替沙星(Gatifloxacin)	(111)
3.1.8	莫西沙星(Moxifloxacin)	(113)
3.1.9	格帕沙星(Grepafloxacin)	(114)
3.2	HPLC 法在 1,8-萘啶羧酸类喹诺酮抗生素质控分析中的应用	(115)
3.2.1	依诺沙星(Enoxacin)	(115)
3.2.2	吉米沙星(Gemifloxacin)	(116)
3.2.3	曲伐沙星(Trovafloxacin)/阿拉曲伐沙星(Alatrovafloxacin)	(117)
4	HPLC 法在多肽、多烯类抗生素质控分析中的应用	(121)
4.1	HPLC 法在多肽类抗生素质控分析中的应用	(121)
4.1.1	万古霉素(Vacomycin)	(121)
4.1.2	去甲万古霉素(Norvacomycin)	(122)
4.1.3	卷曲霉素(Capreomycin)	(124)
4.1.4	多粘菌素(Polymyxins)	(125)
4.1.5	博莱霉素(Bleomycin)	(127)
4.1.6	平阳霉素(Bleomycin A ₅)	(131)
4.1.7	放线菌素 D(Dactinomycin D)	(132)
4.1.8	杆菌肽(Bacitracin)	(133)
4.1.9	环孢菌素 A(Cyclosporin A)	(134)
4.2	HPLC 法在多烯类抗生素质控分析中的应用	(136)
4.2.1	两性霉素(Amphotricin)	(136)
4.2.2	制霉菌素(Nystatin)	(136)
5	HPLC 法在其它类抗生素质控分析中的应用	(139)
5.1	HPLC 法在四环类抗生素质控分析中的应用	(139)
5.1.1	四环素(Tetracycline)	(139)
5.1.2	土霉素(Oxytetracycline)	(140)

5.1.3	金霉素(Chlortetracycline, aureomycin)	(141)
5.1.4	多西环素(Doxycycline)	(143)
5.1.5	美他环素(Metacycline)	(144)
5.1.6	米诺环素(Minocycline)	(145)
5.2	HPLC 法在林可霉素类抗生素质控分析中的应用	(149)
5.2.1	林可霉素(lincomycin)	(149)
5.2.2	克林霉素(Clindamycin)	(152)
5.2.3	克林霉素磷酸酯(Clindamycin phosphate)	(153)
5.3	HPLC 法在利福霉素类抗生素质控分析中的应用	(155)
5.3.1	利福平(Rifampin)	(155)
5.3.2	利福昔明(Rifaximin)	(157)
5.4	HPLC 法在蒽环类抗生素质控分析中的应用	(157)
5.4.1	柔红霉素(Daunorubicin)	(158)
5.4.2	多柔吡星(Doxorubicin)	(159)
5.4.3	吡柔吡星(Pirarubicin)	(161)
5.4.4	阿柔吡星(Aclarubicin)	(161)
5.4.5	依达吡星(Idarubicin)	(163)
5.4.6	FCE23762(Nemorubicin)	(164)
5.5	HPLC 法在其它类抗生素质控分析中的应用	(166)
5.5.1	妥布霉素(Tobramycin)	(166)
5.5.2	依替米星(Etimicin)	(168)
5.5.3	氯霉素(Chloramphenicol)	(170)
5.5.4	利奈唑烷(Linezolid)	(171)
5.5.5	丝列霉素 C(Mitomycin C)	(172)
5.5.6	磷霉素(Fosfomycin)/磷霉素氨丁三醇(fosfomycin trometamol)	(174)
6	Sephadex G-10 凝胶色谱系统分析 β -内酰胺类抗生素中的高分子杂质	(176)
6.1	抗菌药物中的高分子杂质	(176)
6.1.1	抗菌药物中高分子杂质的定义	(176)
6.1.2	抗菌药物中高分子杂质的分类及来源	(176)
6.1.3	β -内酰胺类抗生素中高分子杂质的基本结构	(176)
6.1.4	β -内酰胺类抗生素中高分子杂质的结构特点	(179)
6.1.5	抗生素中高分子杂质的控制策略	(179)
6.2	凝胶色谱法分离分析 β -内酰胺类抗生素中的高分子杂质	(181)
6.2.1	β -内酰胺类抗生素和葡聚糖凝胶的相互作用	(182)
6.2.2	Sephadex G-10 凝胶色谱系统的分离原理及特点	(191)
6.2.3	色谱条件对 β -内酰胺类抗生素在 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中色谱行为的影响	(191)
6.3	自身对照外标法定量测定 β -内酰胺类抗生素中的高分子杂质	(196)
6.3.1	自身对照外标法的原理	(196)

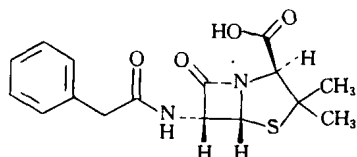
6.3.2	β -内酰胺类抗生素的缔合及缔合峰洗脱条件的选择	(197)
6.3.3	影响准确测定的若干因素	(197)
6.4	Sephadex G-10 凝胶色谱法的应用	(199)
6.4.1	Sephadex G-10 凝胶色谱系统的测定误差	(199)
6.4.2	对 β -内酰胺类抗生素中高分子杂质的分离分析	(199)
7	毛细管电泳法及其在抗生素分析中的应用	(205)
7.1	概述	(205)
7.1.1	毛细管电泳的发展	(205)
7.1.2	毛细管电泳装置	(206)
7.2	毛细管电泳的基本原理	(206)
7.2.1	毛细管电泳的分离模式	(206)
7.2.2	毛细管电泳的基本理论	(209)
7.2.3	胶束电动色谱	(217)
7.3	毛细管电泳与高效液相色谱的比较	(223)
7.3.1	有效性(Efficiency)和可操作性(Performance)	(224)
7.3.2	灵敏度(Sensitivity)	(224)
7.3.3	建立方法的难易程度	(224)
7.3.4	技术的成熟性	(224)
7.3.5	被分离物的理化性质要求	(225)
7.3.6	HPLC 和 CZE 分析方法的相关性	(225)
7.4	毛细管电泳在抗生素分析领域中的应用	(226)
7.4.1	纯度分析	(226)
7.4.2	生物体液分析	(235)
	参考文献	(238)

1 HPLC 法在 β -内酰胺类抗生素质控分析中的应用

1.1 HPLC 法在青霉素质控分析中的应用

1.1.1 青霉素 G (Penicillin G)

结构



青霉素发酵中,苯乙酸(PAA)是青霉素生物合成的重要前体,当发酵液中残余的 PAA 浓度过高时,会抑制青霉素产生菌的生长代谢,因此需及时获得发酵液中残余 PAA 的量和青霉素发酵量。

6-氨基青霉烷酸(6-APA)是半合成青霉素的重要原料,由于其中残存的 PAA 和青霉素 G 直接影响 6-APA 的质量,故在 6-APA 生产中及时测定裂解液中 PAA、青霉素 G 和 6-APA 的含量,对裂解工艺控制及 6-APA 结晶有重要的意义。

采用 HPLC 法可直接测定发酵液及裂解液中的青霉素 G, PAA 和 6-APA。具体为 ODS 色谱柱,以乙腈-磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 为 5.8)=16:84 为流动相,检测波长 235nm,流速 1.5ml/min,室温测定。其典型色谱图如图 1.1 所示。

说明

(1)发酵液先经棉花初滤,再过 0.45 μ m 的微孔滤膜,用磷酸缓冲液稀释后进样;6-APA 裂解液用 0.45 μ m 的滤膜过滤后,用磷酸缓冲液稀释进样。

(2)比较了流动相 pH 为 7.4, 6.5 和 5.8 时的分离结果, pH 为 5.8 时的结果较理想。

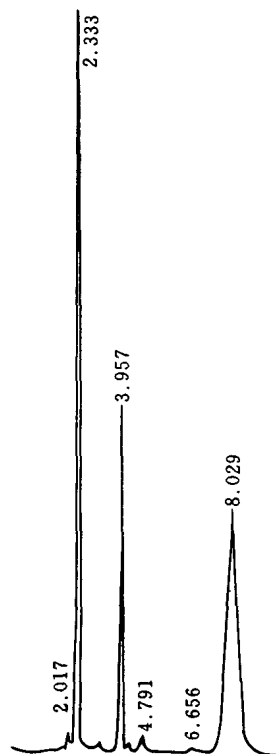
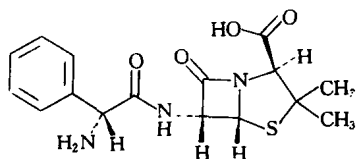


图 1.1 6-APA, PAA 和青霉素 G 的 HPLC 色谱图
色谱柱: Spherisorb C₁₈, 5 μ m
流动相: 乙腈-磷酸缓冲液 (pH 为 5.8)=16:84
检测波长: 235nm;
流速: 1.5ml/min; 柱温: 室温

(3)比较碘量法和 HPLC 法测定青霉素的发酵效价,发现发酵前期,碘量法和 HPLC 法结果基本相同,但发酵中后期,碘量法结果比 HPLC 结果高 5%~10%。提示:HPLC 法较碘量法的专属性更强。

1.1.2 氨苄西林(Ampicillin)

结构



氨苄西林有氨苄西林钠和氨苄西林三水物两种药用形式。其原料可用硝酸汞电位滴定法测定含量,而对制剂可采用咪唑法;但 HPLC 法可满足对其原料和制剂含量测定的需要。

色谱系统:ODS 反相色谱系统,其流动相为醋酸缓冲液(0.01mol/L, pH 为 5.0)-乙腈=90:10,检测波长 230nm,流速 2ml/min,室温测定;并可选用咖啡因因为内标。测定结果与咪唑法相比无显著性差异。在 Spherisorb C₁₈ 色谱柱(10 μ m, 300mm $\times$ 4.6mm i.d)的测定结果见表 1.1 及图 1.2。

表 1.1 氨苄西林与内标的色谱结果

样品	保留时间(min)	半峰宽(s)	理论塔板数	拖尾因子	分离度
氨苄西林	3.87	11.2	2381	1.14	11.6
咖啡因	8.28	15.6	5619	1.09	

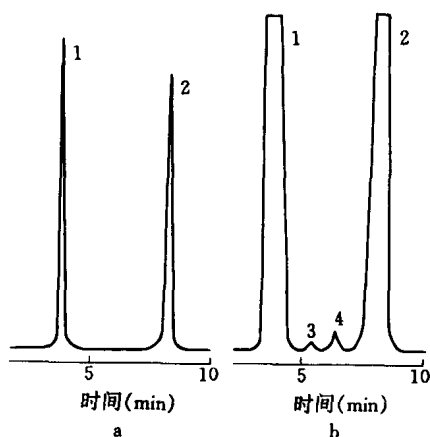


图 1.2 氨苄西林的 HPLC 色谱图

a 样品及内标峰色谱图

b 样品溶液放置 15 天后色谱图

1 氨苄西林;2 咖啡因;3,4 降解物

色谱柱:Spherisorb C₁₈, 10 μ m, 300mm $\times$ 4.6mm i.d

流动相:醋酸缓冲液(0.01mol/L, pH 为 5.0)-乙腈
=90:10

检测波长:230nm

流速:2ml/min

柱温:室温

说明

(1)氨苄西林进样量(x)在 1.6~8.0 μ g 范围内与样品/内标峰面积比(y)呈良好线性关系($y=0.1909x-0.0057, r=0.9999$)。

(2)样品溶液室温放置 24h 内稳定。

(3)氨苄西林降解物及类似物(如头孢氨苄、羟氨苄西林等)对测定无干扰。

(4)USP 从第 22 版起,采用外标法测定氨苄西林含量,检测波长为 254nm;由于 230nm 的峰响应是 254nm 的 2 倍,故可提高检测灵敏度。

(5)对氨苄西林中二聚物等的测定,在 ODS 色谱系统中可采用梯度洗脱法:

流动相 A:乙腈-磷酸缓冲液(0.01mol/L, pH 为 7.0)=10:90

流动相 B: 乙腈-磷酸缓冲液 (0.01mol/L, pH 为 7.0) = 15 : 85

以 1ml/min 的流速, 在 10min 内沿线性梯度曲线从 100% 的 A 液变为 100% 的 B 液。

氨苄西林聚合物的相对保留时间见表 1.2。

表 1.2 氨苄西林聚合物的相对保留时间

化合物	相对保留时间	化合物	相对保留时间
氨苄西林	1.0	四聚物	2.7
二聚物	1.9	五聚物	3.0
三聚物	2.4		

(6) 利用 C_8 色谱系统也可实现对氨苄西林及其聚合物的分离 (图 1.3)。

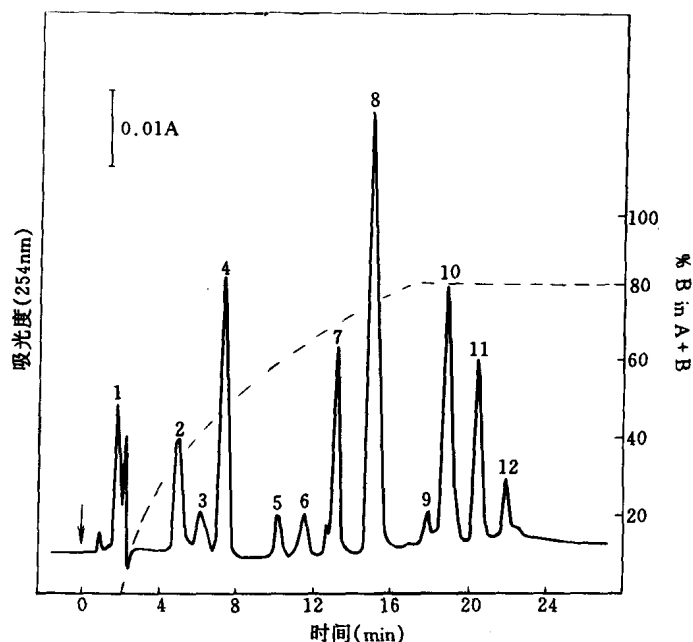


图 1.3 C_8 色谱系统分离氨苄西林及其聚合物

20% 的氨苄西林水溶液, pH=8.5, 室温放置 3 天

1 溶剂峰; 2 开环聚合物; 3, 5, 9 未知杂质; 4 氨苄西林; 6 开环四聚物; 7 开环六聚物;

8 二聚物; 10 四聚物; 11 六聚物; 12 八聚物

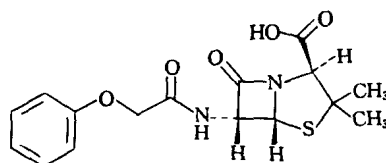
色谱柱: Lichrosorb RP-8, 250mm×3mm i.d., 7 μ m; UV₂₅₄ 检测; 流速为 0.8ml/min; 柱温 22°

流动相 A: 乙腈-磷酸缓冲液 (0.01mol/L, pH 为 7.0) = 10 : 90

流动相 B: 乙腈-磷酸缓冲液 (0.01mol/L, pH 为 7.0) = 20 : 80

1.1.3 青霉素 V (Penicillin V)

结构



青霉素 V 系口服青霉素, 其药用形式为青霉素 V 钾。虽然青霉素 V 钾原料可采用电位滴定法测定其含量, 制剂可采用咪唑法测定。但经比较, HPLC 法测定青霉素 V 钾的原料含量较电位滴定法约低 1%, 测定其片剂的含量较咪唑法约低 2%, 原因是 HPLC 法排除了青霉素 V

中诸杂质,特别是含 β -内酰胺环的有关物质的干扰,导致电位滴定法和咪唑法测定的结果偏高。

色谱系统:ODS 反相色谱系统,其流动相为水-乙腈-冰醋酸=650:350:5.75,检测波长 254nm,流速 1ml/min,室温测定。其典型色谱图如图 1.4 所示。

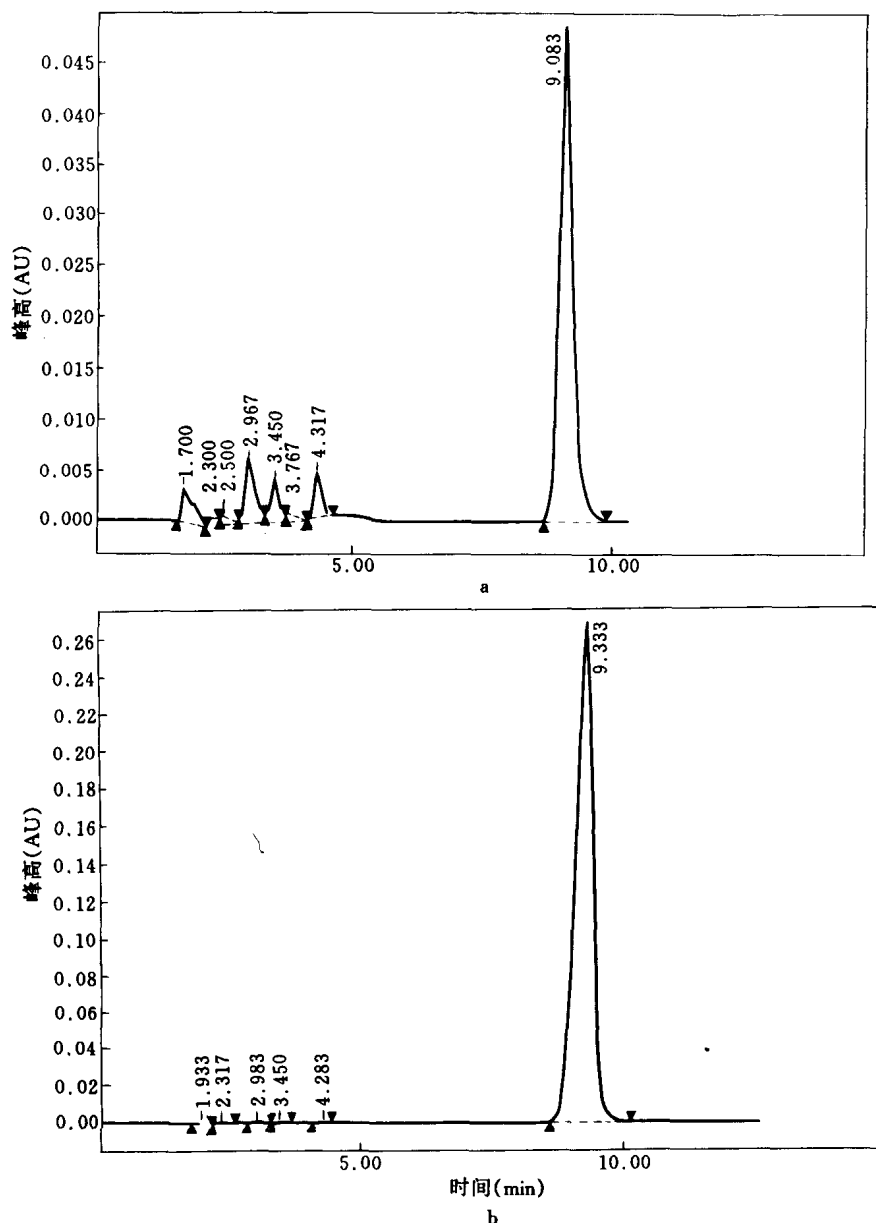


图 1.4 青霉素 V 钾的 HPLC 色谱图(a 青霉素 V 钾及其有关物质混合液;b 青霉素 V 钾片剂)

色谱柱:Nucleosil C₁₈,7 μ m,200mm $\times$ 4.0mm i.d

流动相:水-乙腈-冰醋酸=650:350:5.75

检测波长:254nm;流速:1.0 ml/min;柱温:室温

图 1.4 中,青霉素 V 的保留时间约 9min,副产物对羟基青霉素 V 的保留时间约 3.4min,降解物青霉素 V 噻唑酸的保留时间约 3min,并发现青霉素 V 溶液放置过程中产生保留时间

约为 4.3min 的未知降解物,其片剂中有保留时间约 2.3min 的未知杂质。

说明

(1)青霉素 V 的最大吸收波长为 263nm,故利用 263nm 检测可提高检测灵敏度。

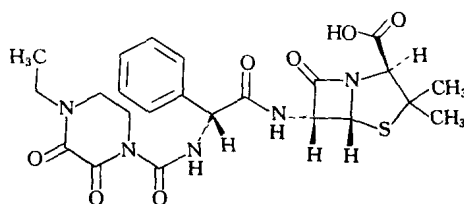
(2)含量测定时,青霉素 V 的进样量约 50 μ g。

(3)青霉素 V 噻唑酸的制备方法为,取青霉素 V 钾约 25mg 置 25ml 量瓶中,加 0.1mol/L 的 KOH 溶液 10ml,摇至澄清,25 $^{\circ}$ C 温度下保温 13min,加 1mol/L 的 HCl 溶液 1ml,加 pH 为 6.5 的磷酸缓冲液至刻度。

(4)在 270nm 波长处,青霉素 V 的吸光度和其副产物对羟基青霉素 V 的吸光度几乎相等,青霉素 V 和青霉素 V 噻唑酸吸光度的转换系数为 1.046。

1.1.4 哌拉西林(Piperacillin)

结构



哌拉西林又称氧哌嗪青霉素,其药用形式为钠盐。用碘量法测定哌拉西林的含量与 HPLC 法相比约高 0.6%,HPLC 法不仅可方便地测定出其含量,并可控制其中间产物及降解物的量。

色谱系统:ODS 反相色谱系统,其流动相为四丁基氢氧化铵磷酸缓冲液(10%的四丁基氢氧化铵 3ml 与 0.2mol/L 的 NaH_2PO_4 溶液 50ml 混合,用磷酸调 pH 至 5.5,用水稀释至 600ml)-甲醇=6:4,检测波长 254,流速 1ml/min,室温测定。

图 1.5 中,哌拉西林的保留时间约为 10min,其酸性降解物的保留时间分别约为 2.1,3.2,

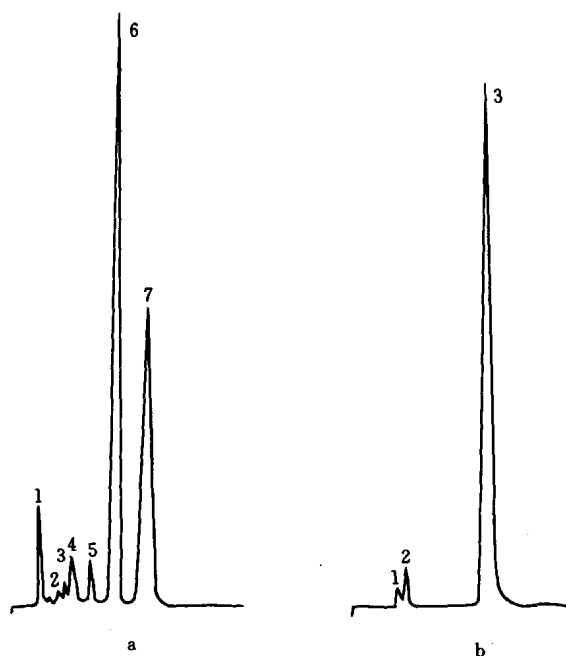


图 1.5 哌拉西林的 HPLC 色谱图

a 哌拉西林及降解杂质混合液(峰 1,2,3,4,5 为降解物;峰 6 为内标;峰 7 为哌拉西林)

b 哌拉西林及中间体(峰 1 为 EPCE;峰 2 为氨苄西林;峰 3 为哌拉西林)

色谱柱:YWG C_{18} ,10 μ m,

300mm $\times$ 4.0mm i.d

流动相:四丁基氢氧化铵磷酸缓冲液-甲醇=6:4

检测波长:230nm

流速:1.0 ml/min

柱温:室温

4.1, 4.8, 6.3min, 中间体 2-[(4-乙基-2,3-双氧代哌嗪基)-1-甲酰胺]苯乙酸(EPCP)和氨苄西林的保留时间分别约为 3.5, 4.0min。

说明

(1)测定中可采用对乙酰氨基苯甲醚为内标,流动相 pH 值可影响内标与哌拉西林间的分离度(表 1.3)。采用不同的波长检测时,应调整内标的用量。254nm 检测:哌拉西林和内标的浓度分别为 0.4 和 0.05mg/ml;230nm 检测:哌拉西林和内标的浓度分别为 1 和 0.4mg/ml。

表 1.3 流动相 pH 值对内标与哌拉西林分离度的影响

流动相 pH	内标与哌拉西林保留时间的差值 (min)	流动相 pH	内标与哌拉西林保留时间的差值 (min)
6.03	0.725	5.54	2.434
5.75	1.52	5.04	1.921

(2)230nm 检测时,样品浓度在 0.7~1.2mg/ml 范围内,哌拉西林与内标峰面积比值与样品浓度呈线性关系,其相关系数为 0.995。

(3)230nm 检测可提高样品的检测灵敏度,但 254nm 测定的重现性更佳。

(4)哌拉西林在酸性和碱性条件下的降解产物不同(表 1.4)。

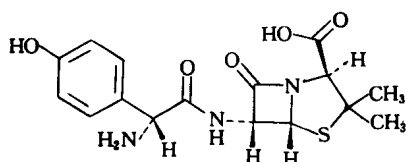
表 1.4 不同条件下哌拉西林的降解物及相对保留时间的比较

	酸性条件	碱性条件		酸性条件	碱性条件
降解物 1	0.20	0.23	降解物 5	0.59	0.39
降解物 2	0.30	0.26	降解物 6		0.48
降解物 3	0.38	0.28	哌拉西林	1	1
降解物 4	0.45	0.32	降解物 7		1.11

(5)不同的哌拉西林生产工艺生产出的样品,中间体 2-[(4-乙基-2,3-双氧代哌嗪基)-1-甲酰胺]苯乙酸(EPCP)和氨苄西林可以不同时存在,国内工艺的产品中没有氨苄西林。

1.1.5 阿莫西林(Amoxicillin)

结构



阿莫西林又称羟氨苄青霉素,有阿莫西林三水物和阿莫西林钠两种药用形式。前者用于口服制剂,后者用于注射剂。阿莫西林常用的 HPLC 色谱系统见表 1.5。阿莫西林中诸相关物质的结构如图 1.6 所示

表 1.5 阿莫西林分析中常用的 HPLC 系统

方法	色谱柱	检测波长 (nm)	柱温	流速 (ml/min)	流动相
1	ODS	230	40°C	1.5	磷酸缓冲液(0.02mol/L, pH 为 5.0)-甲醇=93:7
2	ODS	230	室温		磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 为 4.5)-甲醇=95:5
3	C ₈	254	30°C	1.0	磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH 为 5.0)-甲醇=94:6
4	ODS	254	室温	1.5	1.25%的醋酸液-甲醇=80:20
5*	ODS PLRP-S	230	室温	1.5	磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH 为 5.0)-乙腈=96:4

注: * 表示方法 5 中 ODS 柱为 USP 方法;PLRP-S 为聚苯乙烯-二乙烯苯柱。

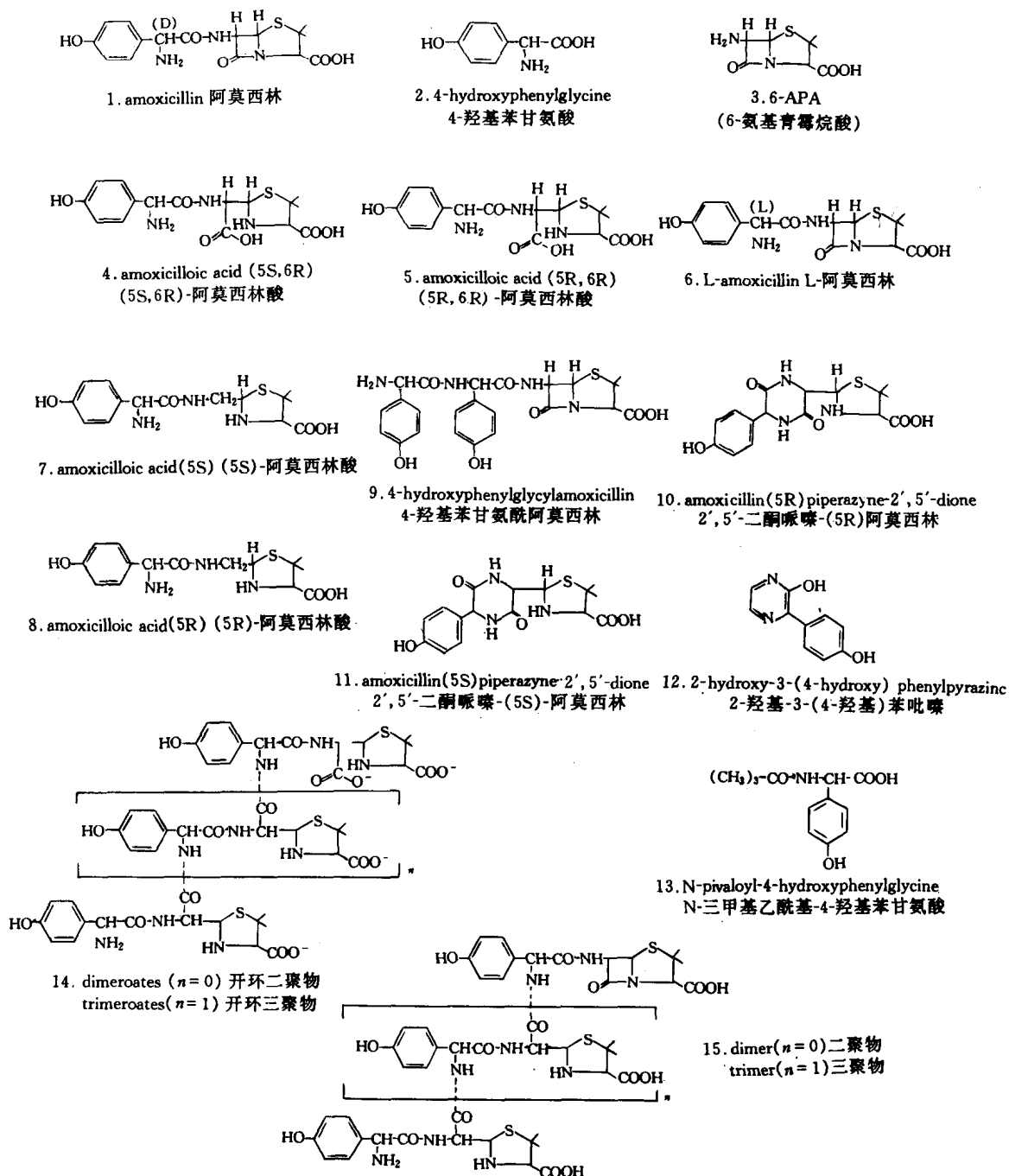


图 1.6 阿莫西林中诸相关物质的结构

说明

(1) 上述 5 种色谱系统中, 阿莫西林和诸相关物质均可得以较好地分离, 但由于阿莫西林相关物质结构差异较大, 等度洗脱系统不适合相关物质的分析。

(2) 在 ODS 色谱系统、 C_8 色谱系统和聚苯乙烯-二乙烯苯色谱系统中, 相关物质的洗脱顺序基本相同, 选择性基本相似。